Dott. Claudio Pulcher

Curriculum Vitae e pubblicazioni scientifiche

Torino, Giugno 1934 - XII

TORINO
TIPOGRAFIA EDITRICE « MINERVA »
Via Martiri Fascisti, 15
1934 - XII

Dott. Claudio Pulcher

Curriculum Vitae
e pubblicazioni scientifiche

Torino, Giugno 1934 - XII

TORINO
TIPOGRAFIA EDITRICE « MINERVA »
1934 - XII

INDICE

Dott. Claudio Pulcher

Curriculum vitae

Numquam autem invenietur,
si contenti fuerimus inventis.
Seneca: Epistulae morales XXXIII.

Nacque a Trieste il 26 febbraio 1889.

Conseguì la licenza liceale nel 1907 presso il Civico Liceo-Ginnasio « Dante Alighieri » di Trieste.

Frequentò i corsi di medicina nell'Università di Vienna, conseguendovi il 13 marzo 1913 la laurea in Medicina e Chirurgia.

Intraprese quindi a scopo di studi, viaggi in Europa, in Egitto, in India e nell'Estremo Oriente.

Stabilitosi a Roma, frequentò nel 1929 la Clinica Psichiatrica di quell'Università e sotto la guida del Prof. U. Cerletti vi eseguì studi d'istopatologia del sistema nervoso (v. alleg. N. 7).

Trasferitosi nel 1922 a Torino, fu nominato dapprima assistente volontario, poi aiuto straordinario nell'Istituto di Fisiologia di quella Università. Nel Laboratorio diretto dal Professor A. Herlitzka s'impratichì dei metodi sperimentali propri della fisiologia e biochimica dedicandosi particolarmente a studi di chimico-fisica e fisica applicata alla biologia (v. alleg. N. 8).

Nel 1925 fu nominato aiuto nell'Istituto di Patologia Generale della stessa Università, carica nella quale venne confermato negli anni successivi.

Conseguì per titoli e per esame la libera docenza in Patologia Generale con Decreto in data 18 marzo 1929.

Circa l'opera svolta dal P. nell'Istituto diretto dal Professor B. Morpurgo, questi attesta quanto segue (v. alleg. N. 9):

« In questi anni (il P.) ha eseguito una serie di ricerche sperimentali, secondo le proprie vedute e tendenze scientifiche. I

temi trattati ed i metodi escogitati ed adoperati sono completamente suoi. Io non sono intervenuto che alla fine di ciascun lavoro per rendermi conto dell'esattezza dei risultati e giudicare le conclusioni che da queste potevano esser tratte.

« Ha inoltre ammaestrato alcuni allievi in certe parti della patologia sperimentale, delle quali si era particolarmente interessato.

« Quanto ai rapporti con la mia persona basta che ricordi il fatto che per otto anni ho creduto giusto di tenerlo come collaboratore ».

Elenco delle Pubblicazioni

1. — I nuovi metodi per la dimostrazione della spirocheta pallida nelle sezioni di tessuto cerebrale (*Riv. sper. di Freniatria,* vol. XLV, f. 1 - 2, 1921).

2. — L'azione della perfusione dell'alcool etilico sulla contrazione dei muscoli di rana (*Arch. di Scienze Biol.,* vol. V, f. 3 - 4, 1924).

3. — L'azione dell'alcool etilico sui muscoli in rapporto alla temperatura (*Arch. di Scienze Biol.,* vol. VII, f. 1 - 2, 1925).

4. — Conseguenze dello strappamento e strozzamento di nervi motori sulla curva di contrazione dei muscoli (*Arch. di Scienze Biol.,* vol. VII, f. 3 - 4, 1925).

5. — Sur les altérations anatomiques et fonctionnelles des muscles après l'arrachement et l'étranglement du nerf moteur. (In collaborazione con S. Milone). (*C. R. Assoc. d. anatomistes,* XX réunion, 1925).

6. — Azione dell'acido solforico e dell'acido acetico sul bacillo del tubercolo (*Arch. Scienze Med.,* vol. L, 1927).

7. — Colorazioni istologiche e punto isoelettrico (*Arch. Scienze Med.,* vol. L, 1927).

8. — La colorazione di elementi fissati in rapporto al punto isoelettrico (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.,* vol. II, f. 3, 1927).

9. — Le variazioni della concentrazione degli idrogenioni nella fagocitosi (*Arch. Scienze Med.,* vol. XLIX, f. 6, 1927).

10. — Le variazioni del pH nella fagocitosi - Nota II (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.,* vol. II, f. 7, 1927).

11. — Dimostrazione « in vivo » degli scambi gassosi a mezzo indicatori (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.,* vol. II, f. 3, 1927).

12. — Sulla cataforesi del virus del sarcoma di Peyton Rous (*Arch. Scienze Med.,* vol. LII, f. 7, 1928).

13. — Le variazioni del pH nella fibra muscolare dimostrate a mezzo di indicatori iniettati nell'animale vivo (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.,* vol. IV, f. 6, 1929).

14. — Ueber die Adsorption des Roussarkomvirus seitens elektropositiven und elektronegativen Hämoglobins (*Zeitschr. f. Krebsf.,* vol. XXXII, f. 3, 1930).

15. — Sull'adsorbimento del virus del sarcoma dei polli da parte dell'emoglobina (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.,* vol. V, f. 6, 1930).

16. — Sulla distribuzione degli elementi corpuscolati del sangue provocata dal flusso sopra superfici di vetro (*Soc. It. Biol. Sper.*, vol. V, f. 3, 1930).
17. — Sul raggrinzamento degli eritrociti in rapporto al punto isoelettrico dell'emoglobina (*Soc. It. Biol. Sper.*, vol. VI, f. 1, 1931).
18. — Sulla posizione marginale dei leucociti nella corrente del sangue (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. VI, f. 7, 1931).
19. — Intorno alla situazione dei leucociti nel sangue fluente (*Arch. Scienze Med.*, vol. LVI, f. 3, 1932).
20. — Untersuchungen über Isoagglutination und elektrokinetisches Potential der Erythrocyten mittels einer neuen Kataphoresekammer (*Pflügers Archiv f. gesamte Physiologie*, vol. 232, f. 2, 1933).
21. — Isoagglutinazione e carica elettrica dei corpuscoli rossi (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. VIII, f. 1, 1933).
22. — Intorno all'adesione dei globuli rossi a superfici di vetro (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. VIII, f. 6, 1933).
23. — L'aumento del potere isoagglutinante del siero studiato in rapporto alla carica elettrica dei globuli rossi agglutinati. (In collaborazione con L. Biancalana). (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. VIII, f. 6, 1933).
24. — Ricerche intorno ai fattori fisici dell'isoagglutinazione (*Giorn. di Batt. e Immun.*, vol. XII, f. 5, 1934).

I. — Batteriologia ed immunbiologia

6. — Azione dell'acido solforico e dell'acido acetico sul bacillo del tubercolo (*Arch. per le Scienze Mediche,* vol. L, 1927).

E' la prima ricerca sistematica circa l'azione dell'acido solforico e dell'acido acetico sui micobatteri della tubercolosi da cultura pura.

Risultò dagli esperimenti che l'*acido solforico al 15 % vol. è innocuo per il bacillo, al 23,5 % vol. ne attenua la virulenza e lo sviluppo, nella concentrazione del 44 % vol. uccide tutti i germi della sospensione.* Questi risultati hanno interesse non solo teorico ma anche pratico in quanto fra i metodi per l'isolamento di questi bacilli dallo sputo, quello all'acido solforico ha avuto la più larga applicazione. Mentre gli AA. sono concordi circa la superiorità di questo metodo, non vi è unità di opinione per quanto riguarda la concentrazione dell'acido solforico che serva a distruggere gli altri germi senza alterare nel contempo la vitalità e virulenza dei bacilli di Koch. Infatti nei metodi di Bossan e Bandy (1922), di Löwenstein (1924) e di Sumigoshi (1924) l'acido solforico viene usato nella concentrazione rispettivamente del 5 %, 8 % e 20 %. Con il metodo di Hohn (1929), il materiale contenente i bacilli viene trattato con acido solforico in concentrazioni variabili dal 6 % al 12 %.

Dal lavoro del P. risulta che i metodi nei quali l'acido solforico viene usato in concentrazioni superiori al 15 % vol. sono senz'altro da rigettare e che è anzi consigliabile d'adoperare quest'acido in concentrazioni più diluite.

Gli esperimenti circa la resistenza del bacillo del tubercolo all'acido acetico sono stati istituiti partendo dal presupposto che la concentrazione di quest'acido nociva al germe potesse differire notevolmente da quella nociva dell'acido solforico; l'involucro cereo, che costituisce la ragione della resistenza di

questi germi agli acidi forti, era forse un ostacolo insufficente per gli acidi organici poco dissociati ma lipoidoliti. Una verifica sperimentale di quest'ipotesi era tanto più interessante, in quanto A. E. Porter non aveva osservato nel 1917 differenza alcuna tra gli acidi acetico, citrico, della serie grassa e l'acido solforico circa la concentrazione di questi acidi nociva per il bacillo di Koch.

Dalle ricerche dell'A. è risultato che l'acido acetico è dannoso ai germi in concentrazione 15 volte più debole in confronto a quella dell'acido solforico nociva per il bacillo.

Il P. notò inoltre che l'acido solforico agisce per disintegrazione ossidativa dei germi poichè la sospensione bacillare nella soluzione battericida, assume un colore brunastro. L'acido acetico agisce invece verosimilmente per il suo potere lipoidolita.

Anche le ricerche intorno all'azione dell'acido acetico hanno un certo interesse pratico. Infatti il Löwenstein nel suo metodo per l'isolamento dei bacilli della tubercolosi dal sangue ha adoperato per molti anni quest'acido alla concentrazione del 2,5 % per ottenere l'emolisi e soltanto da poco tempo ha in questo punto modificato il metodo sostituendo a quest'acido l'acqua distillata. E' probabile che il Löwenstein, se le ricerche dell'A. gli fossero state note, avrebbe apportato già prima questa modifica al suo metodo. La concentrazione del 2,5 % è infatti troppo vicina a quella del 3,3 %, dimostrata dal P. tossica per i germi, e perciò è inadatta per un metodo che dovrebbe servire ad isolare singoli germi dal sangue circolante.

12. — Sulla cataforesi del virus del sarcoma di Peyton-Rous (*Arch. per le Scienze Mediche,* vol. VI, 1928).

E' la prima ricerca intorno alla carica elettrica del virus filtrabile del sarcoma dei polli.

Non esistono che tre ricerche di data anteriore circa la carica elettrica di agenti filtrabili, cioè una del Guardabassi sul batteriofago (1926), una sul virus filtrabile della tubercolosi (Cluset, Chevallier, Hofmann - 1927), ed una terza sul virus aftoso (Olitzky e Boez - 1927).

L'importanza di queste prove è evidente se si pensi alla scarsità di dati positivi circa la costituzione chimica e chimico-

fisica dei virus filtrabili in genere e del principio oncogeno del sarcoma dei polli in particolare.

Gli esperimenti furono eseguiti col metodo della catoferesi. L'apparecchio costruito a questo scopo dall'A. costituisce un notevole miglioramento rispetto agli apparecchi sinora adoperati (Michaelis, Northrop e Petow) poichè permette di prelevare con facilità ed esattezza dal tubo ad U quella porzione del liquido che più interessa per la verifica della migrazione catoforetica del virus. L'apparecchio così modificato dall'A. venne infatti usato con vantaggio dal Guardabassi nel 1929 (« Rivista di Biologia », XI, fasc. V-VI) per l'esame cataforetico di parecchi virus filtrabili.

L'A. potè verificare che l'agente eziologico del sarcoma di Peyton-Rous nel liquido con reazione dal pH 5,8 al pH 7,7 ha una carica elettrica negativa; è quindi a questo riguardo simile agli organismi microbici e diverso da alcuni agenti filtrabili (virus aftoso, virus mosaico del tabacco, batteriofago) che hanno una carica elettrica positiva.

Il lavoro di P. venne confermato (senza esser citato) da ricerche di due AA. giapponesi (Hisashi Nakajima e Waro Nakahara, « Gann », vol. 26, 181, 1932) dalle quali è risultato parimenti che il virus del sarcoma di pollo ha una carica negativa alla reazione del liquido dal pH 4,3 al pH 9.

14. — Ueber die Adsorption des Roussarkomvirus seitens elektropositiven und elektronegativen Hämoglobins (*Zeit. f. Krebs*, vol. XXXII, 327, 1930).

15. — Sull'adsorbimento del virus del sarcoma dei polli da parte dell'emoglobina (*Boll. Soc. It. Biolog. Sper.*, vol. V, f. 6, 1930).

Questa ricerca è stata istituita allo scopo di confermare con esperimenti di adsorbimento i risultati ottenuti con la cataforesi circa la carica elettrica negativa del virus del sarcoma di Peyton-Rous. Queste prove hanno un interesse particolare poichè ricerche di S. Milone (« Arch. per le Scienze Mediche », vol. LII, fasc. 7, 1928) sullo stesso virus, circa un adsorbimento maggiore da parte di polveri elettronegative (caolino e polvere di diatomea) in confronto a quello da parte di polveri elettro-

positive (solfato di bario e ossido idrato di ferro), parlerebbero per una carica elettrica positiva dell'agente oncogeno.

L'interpretazione degli esperimenti di adsorbimento per rispetto alla carica elettrica della sostanza adsorbita, si basano sulla teoria di Michaelis, secondo la quale le particelle dotate di carica elettrica adsorbirebbero soltanto sostanze di carica elettrica di segno contrario. Questa regola, fondata sui risultati ottenuti con sostanze di costituzione chimica semplice, perde la sua validità assiomatica quando la fase adsorbente si trovi a contatto di un miscuglio colloidale complesso qual'è quello del filtrato del sarcoma di Peyton-Rous; i risultati sperimentali diventano poi del tutto incerti quando si debbano usare, come nel caso di Milone, sospensioni di polveri differenti fra loro non solo per carica elettrica ma anche per costituzione chimica e fisica. E' noto che bastano minime impurità, dovute per es. al modo della preparazione, per modificare notevolmente il potere adsorbente di una polvere (carbone da legno di tiglio e carbone animale).

Per eliminare almeno le cause d'errore cagionate dall'uso di polveri differenti per costituzione chimica e fisica, l'A. ricorse per gli esperimenti di adsorbimento dell'agente eziologico del virus del sarcoma di Peyton-Rous, all'emoglobina fissata con l'alcool assoluto e ridotta ad una polvere insolubile. L'A. verificò con la cataforesi, che questa polvere, a ragione del suo punto isoelettrico in prossimità del pH 7, ha una carica elettrica positiva quando venga sospesa in un liquido acquoso debolmente acido (pH 5,8) ed una carica negativa se sospesa in un liquido debolmente alcalino (pH 8). *E' questo il primo esempio in campo biologico di prove d'adsorbimento con una polvere che cangia di carica elettrica per spostamenti di reazione del liquido compatibili con l'integrità dei virus filtrabili.*

Dagli esperimenti è risultato che il virus di Peyton-Rous viene adsorbito più intensamente dell'emoglobina elettropositiva che non da quella elettronegativa per cui *da queste prove di adsorbimento viene confermato il risultato ottenuto con la cataforesi circa la carica negativa dell'agente oncogeno.*

1. — I nuovi metodi per la dimostrazione della spirocheta pallida nelle sezioni di tessuto cerebrale (*Rivista Sperim. di Freniatria,* vol. XLV, fasc. 1 - 2, 1921).

L'A. applicò in questa ricerca, tra i primi in Italia, il metodo di Jahnel per la dimostrazione della spirocheta pallida nel cervello dei paralitici. I metodi di Levaditi e Noguchi male si prestano a questo scopo, poichè l'argento oltre che dai treponemi viene ridotto dalle fibre nervose e dai filamenti della nevroglia. L'identificazione della spirocheta nella corteccia cerebrale è così resa oltremodo difficile ed anzi è possibile solo quando il tessuto sia infestato da ammassi di parassiti. Il metodo introdotto da Jahnel ha la prerogativa che con esso risultano impregnati dall'argento i treponemi mentre il tessuto nervoso non fissa menomamente il metallo.

L'A. ha esaminato con questo metodo la corteccia cerebrale di paralitici, la quale per molti anni era rimasta in formalina, ed ha potuto constatare la presenza dei treponemi in 7 casi su 10 esaminati. Il lavoro dà informazioni circa la morfologia della spirocheta nel tessuto nervoso ed intorno ai rapporti fra presenza dei parassiti ed alterazioni istologiche del tessuto.

9. — Le variazioni della concentrazione degl'idrogenioni nella fagocitosi (*Arch. per le Sc. Med.*, vol. XLIX, fasc. 6, 1927).

10. — Le variazioni del pH nella fagocitosi. - Nota II. (*Boll. della Soc. Ital. di Biologia Sperim.*, vol. II, fasc. 7, 1927).

Già il Metschnikoff aveva osservato che i granuli di tornasole fagocitati cangiano la loro tinta azzurra in color rosso vivo. Himmel aveva notato che i bacteri fagocitati tinti col rosso neutro si colorano in rosso vivo. Da queste osservazioni era risultato che le particelle fagocitate vengono a trovarsi in un ambiente acido.

L'A. si è proposto con questa ricerca di precisare il grado di quest'acidità nelle varie fasi della fagocitosi.

Non è sembrato a prima vista difficile il risolvere questo problema a mezzo dell'osservazione di particelle colorate con indicatori e fagocitate. Ma da prove preliminari risultò che le particelle e i granuli che di solito si adoperano per la fagocitosi (carbone, bacteri, caolino, albume denaturato e polverizzato) non si prestano per questi esperimenti perchè queste sostanze non si colorano abbastanza intensamente con gl'indicatori ftalei-

nici, colori questi tutti acidi (blu bromotimolo, porpora bromocresolo, blu bromofenolo).

L'A. è riuscito tuttavia nell'intento adoperando come materiale da essere fagocitato, leucociti di cavia fissati col colore, i granuli acidofili dei quali si possono colorare intensamente con gl'indicatori.

I leucociti così colorati, sospesi in una serie di soluzioni tampone a pH noto, cangiano di tinta in corrispondenza alla reazione del liquido e possono servire di paragone per apprezzare il pH dei leucociti colorati e fagocitati.

Dalle ricerche risultò che i leucociti di cavia denaturati col calore, quando vengono inglobati dai microfagi della rana si trovano in un ambiente col pH 7,3. Questa reazione dopo 2 ore circa si porta al pH 6 e dopo 3 ore, in coincidenza col formarsi di un vacuolo di digestione, al pH 5,2. L'acidità alla quale si trova la particella inglobata anche dopo 4 - 5 ore non sorpassa il pH 4,6.

I leucociti uccisi col calore e colorati si trovano appena inglobati dai microfagi della cavia in un ambiente col pH 7,3. Questa reazione si porta gradatamente al pH 5 ed arriva dopo qualche ora al pH 3,7, acidità che non viene mai sorpassata.

Da queste reazioni acide è legittimo il supporre che i fermenti attivi nella fagocitosi per il dissolvimento di particelle proteiche inglobate, almeno in un primo tempo, sono del tipo peptico.

L'A. ha osservato inoltre che la reazione acida è circoscritta alla particella fagocitata poichè non è raro di vedere nello stesso elemento fagocitario due leucociti fagocitati aventi ciascuno una diversa tonalità di colore.

20. — Untersuchungen über Isoagglutination und elektrokinetisches Potential der Erythrocyten mittels einer neuen Kataphoresekammer (*Pfügers Archiv f. gesamte Physiologie*, vol. 232, fasc. 2, 1933).

21. — Isoagglutinazione e carica elettrica dei corpuscoli rossi (*Boll. Soc. It. di Biol. Sper.*, vol. VII, fasc. 1, 1933).

22. — Intorno all'adesione dei globuli rossi a superfici di vetro (*Boll. Soc. It. di Biol. Sper.*, vol. VIII, fasc. 6, 1933).

23. — L'aumento del potere isoagglutinante del siero studiato in rapporto alla carica elettrica dei globuli rossi agglutinati. (In collaborazione con L. Biancalana). (*Boll. Soc. It. di Biol. Sper.*, vol. VIII, fasc. 6. 1933).

24. — Ricerche intorno ai fattori fisici dell'isoagglutinazione (*Giorn. di Batt. e Imm.*, vol. XII, fasc. 5, 1934).

In questo gruppo di lavori sono riportati i risultati di ricerche eseguite dall'A. intorno ai fattori fisici e chimico-fisici in giuoco nell'isoagglutinazione delle emazie umane. Più particolarmente furono da lui studiati, la carica elettrica e le forze di adesione e coesione dei corpuscoli rossi trattati con sieri agglutinanti e non agglutinanti, nonchè l'affinità di questi per l'acqua.

Circa la carica elettrica dei corpuscoli rossi in rapporto alla isoagglutinazione esiste un unico lavoro di V. Schröder. In accordo a quanto altri ricercatori avevano osservato per le agglutinazioni aspecifiche e da sieri immuni, quest'A. verificò che il fenomeno dell'isoagglutinazione è accompagnato da una diminuzione della carica elettrica delle particelle agglutinate. La misurazione del potenziale elettrocinetico dei globuli fu eseguita a mezzo della camera cataforetica di Northrop la quale dovendo essere usata in posizione orizzontale rende necessario di aumentare con aggiunte di saccarosio la densità del liquido nel quale sono sospesi i corpuscoli onde impedirne il rapido sedimentare.

Per ovviare a quest'inconveniente il P. (19, 20) costruì una camera cataforetica da adoperarsi situata verticalmente che permette la misura del potenziale elettrocinetico delle emazie sospese in liquidi di densità vicina a quella dell'acqua. *Si sono potute ottenere così le prime misure cataforetiche esatte su corpuscoli rossi sospesi in sieri diluiti a metà con soluzione fisiologica.* Nel lavoro è indicato inoltre un metodo grafico per ricavare dai valori della migrazione elettrocinetica l'esatta velocità dei corpuscoli rossi nel campo elettrico.

L'A. non si limitò a misurare la carica elettrica delle emazie nei sieri agglutinanti e non agglutinanti, ma estese le ricerche al potere agglutinante del siero in rapporto alla diminuzione della carica elettrica dei corpuscoli agglutinati (22). *Dagli esperimenti risultò che esiste una relazione quantitativa fra la forza*

agglutinante del siero e la diminuzione percentuale della carica del corpuscolo da esso agglutinato. Con l'aumentare del titolo agglutinante del siero, la carica elettrica dei corpuscoli rossi agglutinati diminuisce proporzionalmente. Accettando l'ipotesi secondo la quale agglutinazione e diminuzione della carica elettrica sono cagionate dall'adsorbimento da parte dei corpuscoli di euglobuline del siero, l'A. crede di poter spiegare la maggiore o minore diminuzione della carica elettrica con un adsorbimento più o meno intenso da parte dei globuli rossi di euglobuline del siero.

Non esistevano lavori intorno alle forze di adesione e di coesione fra corpuscolo rosso e corpuscolo rosso in rapporto alla isoagglutinazione, poichè nessun A. è riuscito di misurare queste energie, certo di molta importanza per i fenomeni di agglutinazione. *Il P., dopo tentativi inutili di misurazioni dirette, ricorse ad un metodo che gli permise di ottenere per il primo qualche dato significativo circa le energie di coesione operanti nell'isoagglutinazione.* L'A. (21, 23) ha eseguito a questo scopo una serie di ricerche intorno all'adesione ad una superficie di vetro molato dei globuli rossi trattati con sieri agglutinanti e non agglutinanti. Il metodo consiste nel verificare se i corpuscoli rossi si attaccano o scivolano sul fondo d'una camera di vetro, costruita sul tipo di quella Bürker, inclinata ad un angolo che può variare da 25° a 75°.

Dalle ricerche dell'A. è risultato anzitutto che nelle sospensioni prive di colloidi proteici i corpuscoli aderiscono tutti al vetro. I colloidi proteici in concentrazione sufficente (siero di sangue 1 - 1,2 %, albume d'uovo 7 - 8 %) impediscono invece la adesione al vetro di gran parte dei globuli rossi e ne permettono lo scivolamento sul piano vitreo. Sospesi in soluzioni più diluite, quasi tutti i corpuscoli rimangono attaccati al vetro; sospesi in soluzioni più concentrate di colloide proteico lo scivolamento è totale. Adoperando per contro sieri agglutinanti, gli accumuli delle emazie agglutinate [i quali nella camera Bürker si formano in un modo particolare (vedi microfotogr. della pubblicazione 23)] per la massima parte aderiscono al vetro. Le emazie solamente impilate, scivolano tutte senza eccezione sul vetro inclinato. *Con questo metodo dello scivolamento l'A. ha potuto per il primo accertare un cambiamento nello stato fisico della superficie dei corpuscoli agglutinati, cambiamento che si mani-*

festa in un aumento delle forze che fanno aderire le emazie al vetro molato. E' quindi ragionevole ammettere che siano aumentate, per opera dei sieri agglutinanti, anche le forze di coesione che fanno aderire corpuscolo a corpuscolo.

Alcuni esperimenti furono eseguiti con lo scopo di verificare per mezzo dell'« interface reaction » di S. Mudd se l'isoagglutinazione delle emazie fosse accompagnata da un cambiamento nell'affinità per l'acqua delle medesime. Con questi esperimenti non s'è potuto constatare per effetto del siero isoagglutinante una diversa affinità per l'acqua dei corpuscoli rossi isoagglutinati in confronto a quella dei corpuscoli trattati con sieri non agglutinanti.

II. — **Sangue e circolazione**

16\. — Sulla distribuzione degli elementi corpuscolati del sangue provocata dal flusso sopra superfici di vetro (*Boll. Soc. It. di Biol. Sperim.*, vol. V, fasc. 3, 1930).

18\. — Sulla posizione marginale dei leucociti nella corrente del sangue (*Boll. Soc. It. di Biol. Sperim.*, vol. VI, fasc. 7, 1931).

19\. — Intorno alla situazione dei leucociti nel sangue fluente (*Arch. Scienze Med.*, vol. LVI, fasc. 3, 1932).

Di studi recenti su quest'argomento non esisteva che una ricerca di Fähreus, pubblicata nel 1928, dalla quale è risultato che i leucociti nella corrente del sangue di mammifero, si portano verso l'asse della medesima.

L'A. trovò la pubblicazione del Fähreus quando a ricerca conchiusa stava scrivendo il lavoro N. 19 dell'elenco.

L'A. aveva osservato casualmente che, quando una goccia di sangue di mammifero viene fatta scorrere non troppo lentamente in un capillare di vetro, in testa alla colonna del sangue, dopo percorso il capillare, si trovano in prevalenza gli elementi leucocitari (16).

Per spiegare questo fenomeno il P., con un metodo accurato, ha studiato gli spostamenti quantitativi delle singole categorie di cellule causati dal flusso del sangue nel capillare di vetro e da questi spostamenti potè trarre delle conclusioni in-

torno alla velocità dei diversi elementi e quindi intorno alla loro posizione nella corrente sanguigna. La ricerca è stata laboriosa, non per difficoltà sperimentali, chè i risultati sono stati sempre netti ed evidenti, ma perchè questi in nessun modo si conciliavano con la teoria della posizione marginale dei leucociti che da tutti gli AA. veniva considerata inoppugnabile. Soltanto un gran numero di prove eseguite col capillare di vetro, le microfotografie istantanee del sangue fluente nel capillare e le misurazioni della velocità di caduta nel liquido dei corpuscoli rossi e bianchi convinsero alla fine l'A. che la teoria della posizione marginale dei leucociti è del tutto insostenibile, almeno per quanto riguarda il sangue di mammifero.

Dalle ricerche l'A. potè ricavare i seguenti risultati: nella corrente del sangue i corpuscoli bianchi si trovano in media in una posizione più assiale di quella occupata dai corpuscoli rossi. Degli elementi bianchi i granulociti e monociti hanno una maggiore tendenza di portarsi verso l'asse della corrente che non i linfociti. Nella soluzione fisiologica i granulociti di cavia cadono colla velocità di 0,0023 mm″, i linfociti con quella di 0,0016 mm″, mentre le emazie cadono alla velocità di 0,0012 mm″. *Applicando la legge di Stokes, la densità dei leucociti di cavia è risultata di* 1,039 *ed il loro peso pari a* 1196×10^{-12} g, *la densità dei linfociti pari a* 1,062 *ed il loro peso pari a* 249×10^{-12} g. Il peso di questi elementi è perciò molto maggiore di quello dei globuli rossi che dagli AA. viene valutato pari a 95×10^{-12} g per una densità di 1,09 - 1,1.

I dati intorno alla velocità di caduta nel liquido delle varie categorie di elementi corpuscolati del sangue spiega perfettamente la maggior tendenza dei leucociti di portarsi verso l'asse della corrente, e rende ragione del perchè i globuli bianchi, pur avendo una minore densità dei rossi, non si portino ai margini della corrente sanguigna.

La teoria della posizione marginale dei leucociti nella corrente sanguigna, fondata sugli esperimenti ottenuti dallo Schklarewsky col sangue di rana, è valida per questo sangue, gli eritrociti del quale sono più pesanti dei leucociti e più rapidamente di questi cadono nel liquido. Ma questi risultati non sono assolutamente applicabili al sangue di mammifero, i leucociti del quale hanno un maggior peso ed una maggior velocità di caduta nel liquido che non le emazie.

Con questi esperimenti istituiti dall'A. del tutto indipendentemente sono stati confermati con un nuovo metodo i risultati del Fähreus circa la posizione dei leucociti nella corrente del sangue ed è stato accertato inoltre il peso specifico dei granulociti e dei linfociti.

11. — Dimostrazione « in vivo » degli scambi gassosi a mezzo indicatori (*Boll. Soc. It. Biol. Sperim.*, vol. II, fasc. 3, 1927).

In questo lavoro sono riportate osservazioni eseguite al microscopio della circolazione sanguigna di rane colorate con gli indicatori rosso fenolo e rosso cresolo.

L'A. verificò che il sangue arterioso della cute della rana ha una reazione notevolmente più acida del sangue venoso, fatto questo non ancora segnalato da nessun altro ricercatore. La differenza in concentrazione d'idrogenioni è di pH 0,5.

E' noto che negli omeotermi il pH del sangue arterioso differisce da quello venoso normalmente solo nella seconda cifra decimale. Non è difficile tuttavia comprendere la ragione di questo cambiamento notevole della reazione cui il sangue arterioso della rana va incontro nel percorrere i capillari cutanei. Il sangue delle arterie, il quale nella rana è sangue misto (pH 7 - 7,2), si libera nei capillari della cute completamente dell'anidride carbonica e ritorna al cuore privo di CO_2 e perciò più alcalino (pH 7,6). Nei mammiferi invece il sangue venoso non può cedere all'aria alveolare completamente l'anidride carbonica perchè quest'ultima si trova negli alveoli polmonari alla pressione parziale di 40 mm. circa.

Queste osservazioni dimostrarono a mezzo di indicatori, iniettati nell'animale vivo, l'importanza della circolazione cutanea della rana per l'eliminazione del CO_2.

17. — Sul raggrinzamento degli eritrociti in rapporto al punto isolettrico dell'emoglobina (*Boll. Soc. It. di Biol. Sperim.*, vol. VI, fasc. 1, 1931).

La trasformazione delle emazie in elementi moriformi e spinosi viene generalmente messa in relazione con l'ipertonia del liquido di sospensione, da alcuni AA., con fenomeni di capilla-

rità. Secondo Brinkman e Van Dann questa trasformazione è dovuta alla carica elettrica che dal vetrino, strofinato per la pulitura, passa ai corpuscoli rossi quando per un difetto del loro rivestimento colesterinico questi siano elettricamente male isolati.

L'A. riprendendo lo studio del fenomeno del raggrinzamento degli eritrociti notò in primo luogo che non vi è una relazione causale obbligata fra ipertonia del mezzo e trasformazione dei corpuscoli rossi da rotondi in spinosi, poichè queste forme si possono trovare anche in liquidi ipotonici, in secondo luogo che i corpuscoli si fanno spinosi talvolta anche quando si adoperi un vetrino passato alla fiamma e quindi sicuramente privato d'ogni carica elettrica.

L'A. per spiegare le forme a morula e a spine dei corpuscoli rossi ha, per il primo, fatto delle ricerche circa i rapporti fra la presenza di queste forme nel liquido ed il pH del medesimo, partendo dall'ipotesi che questa trasformazione delle emazie dipendesse dal maggiore o minor grado d'imbibizione dell'emoglobina per uno spostamento nella concentrazione degli idrogenioni. Se quest'ipotesi era esatta, una reazione del liquido, corrispondente al punto isoelettrico dell'emoglobina (pH 6,8), doveva portare con sè il minimo dell'imbibizione di queste sostanze e quindi il raggrinzamento degli elementi.

Gli esperimenti eseguiti dall'A. su corpuscoli rossi sospesi in soluzioni, dello stesso grado d'ipertonia (NaCl 1,3 %) ma di diversa concentrazione idrogenionica (pH dal 5,6 al 8,6), dimostrarono, in accordo con l'ipotesi, in modo evidentissimo, che mentre nelle soluzioni ipertoniche leggermente acide (pH 5,5 - 6,6) o alcaline (pH 7,8 - 8,6) i corpuscoli rossi hanno forma rotonda o sferica, nelle soluzioni con il pH 6,9 - 7,5 le emazie diventano moriformi o spinose. Queste ultime concentrazioni idrogenioniche si trovano precisamente in prossimità del punto isoelettrico dell'emoglobina.

Gli esperimenti rendono verosimile l'ipotesi dell'A. che per il raggrinzamento delle emazie sono in giuoco fenomeni d'idratazione e disidratazione dell'emoglobina, causati da cambiamenti del pH nell'interno del corpuscolo.

Nel 1932 è comparso un lavoro di A. Teitel Bernard (« C. R. S. B. », vol. CIX, 1303) che conferma i risultati dell'A. In un altro lavoro pubblicato nel 1933 dallo stesso Teitel (« Arch.

Roum. de Pathol. exp. », vol. V, fasc. 2) è riportato uno studio accuratissimo sulle proprietà chimico-fisiche delle emazie in generale e di quelle moriformi in particolare.

Questo A. ha ripetuto gli esperimenti circa il raggrinzamento delle emazie e la reazione del liquido di sospensione e conclude che « le résultat de ces expériences confirme entièrement les recherches de Pulcher ». Il Teitel va però più oltre e spiega il fenomeno del raggrinzamento delle emazie con una gelificazione dell'emoglobina per una reazione del liquido, che corrisponde al punto isoelettrico di questa sostanza. Questa gelificazione dell'emoglobina precederebbe la formazione di cristalli che il Teitel ha potuto constatare nei corpuscoli rossi conservati in strato sottile per più giorni e settimane, fra porta-oggetti e copri-oggetti.

Mentre le esperienze dell'A., confermate pienamente dal Teitel, dimostrano l'esistenza d'un rapporto fra il pH del liquido corrispondente al punto isoelettrico dell'emoglobina e il raggrinzamento dei corpuscoli rossi, l'A. non ritiene provata a sufficienza la gelificazione dell'emoglobina come causa del formarsi dei corpuscoli moriformi e spinosi.

III. — **Fisiopatologia del muscolo**

2. — L'azione della perfusione dell'alcool etilico sulla contrazione dei muscoli di rana (*Arch. di Scienze Biol.*, vol. V, fasc. 3 - 4, 1924).

3. — L'azione dell'alcool etilico sui muscoli in rapporto alla temperatura (*Arch. di Scienze Biol.*, vol. VII, fasc. 1 - 2, 1925).

Queste ricerche vennero istituite allo scopo di studiare le modificazioni della contrazione muscolare per azione dell'alcool etilico, sostanza lipoidolita e narcotica. A tal uopo furono registrate miograficamente le contrazioni del gastrocnemio di rane che venivano perfuse con soluzioni di alcool etilico diluito in liquido di Ringer o di Tyrode.

Dagli esperimenti risultò che l'alcool esplica un'azione note-

vole sulla contrazione soltanto quando, nella concentrazione dell'1,3 % al 3 % vol., venga trasfuso nei vasi sanguiferi. Durante la perfusione il tempo latente della contrazione muscolare si allunga dell'11 % circa. L'alcool perfuso provoca contrazioni spontanee a carattere ritmico di tutta la musculatura scheletrica della rana. Lo studio delle curve miografiche ha permesso di verificare che la contrazione muscolare, provocata per stimolo diretto o indiretto, viene modificata nel senso che alla scossa rapida s'aggiunge una contrazione tonica; per il confluire di più contrazioni spontanee, provocate da uno stimolo unico, la contrazione assume talvolta il carattere d'un breve tetano. Queste modificazioni della contrazione del muscolo si manifestano soltanto quando il sistema neuro-muscolare sia integro; non si producono perciò nelle rane curarizzate o nei muscoli col nervo in degenerazione walleriana.

Con altre ricerche, oggetto queste di un altro lavoro (3), l'A. ha verificato che l'alcool conferisce alla curva miografica un carattere tonico soltanto quando la temperatura del muscolo sia inferiore ai 18°. Pertanto non riesce, perfondendo le rane durante la primavera inoltrata o l'estate, di ottenere per effetto dell'alcool un cambiamento della contrazione muscolare altro che quando si abbassi la temperatura del muscolo.

Le modificazioni della contrazione muscolare per azione dell'alcool perfuso, le quali il P. ha ottenuto costantemente in un gran numero di esperimenti, non erano state prima osservate da nessun altro A.

La contrazione tonica del muscolo scheletrico, aggiunta alla scossa clonica sebbene distinta da questa, fu osservata per l'azione di molti veleni, ma venne studiata sopratutto nella contrazione muscolare modificata dalla veratrina ed è servita di conforto alla teoria di Bottazzi sulla duplicità del substrato contrattile.

Ma questi sono veleni che modificano la contrazione per azione diretta sulla fibra muscolare.

Le osservazioni dell'A. intorno all'azione dell'alcool perfuso portano invece il primo esempio d'una sostanza che conferisce un carattere tonico alla contrazione muscolare per la sua azione sui nervi e sulle giunzioni neuro-muscolari. Il Winterstein discutendo nel suo volume « Die Narkose » (I. Springer, 1929) questo lavoro dell'A. osserva infatti che « Sollten diese Beobachtungen

auf breiterer Basis bestätigt werden, so wären sie ein klarer Beweis gegen eine direkte Wirkung der Kontraktursubstanz auf die kontraktilen Teilchen und für ihren Augriffspunkt als Reizmittel der Nervenendorgane ».

L'A. non ha creduto d'eseguire altre ricerche su quest'argomento perchè il numero degli esperimenti, la loro concordanza e la facilità con cui si possono ottenere, costituiscono a suo parere un'abbastanza « breite Basis » alla dimostrazione che l'alcool, in causa del suo potere lipoidolita e narcotico, può trasformare la contrazione muscolare da clonica in tonica per un'azione diretta sui nervi e sulle giunzioni neuromuscolari.

Dalle ricerche (3) sulla contrazione modificata dall'alcool in rapporto alla temperatura è risultato che l'alcool opera questo cangiamento della contrazione solo quando il muscolo abbia una temperatura inferiore ai 18°.

Una spiegazione verosimile di questo fenomeno è fornito da molte osservazioni anche comuni circa il freddo come stimolo alle contrazioni toniche ed alle contratture della muscolatura tanto liscia quanto striata, essendone, per usare un'espressione del Bottazzi, « quasi un eccitamento fisiologico ».

L'azione dell'alcool etilico sul muscolo descritta dal P., merita del resto di essere studiata ancora con metodi cronassimetrici, indagine che l'A. si propone di fare prossimamente.

4. — Conseguenze dello strappamento e strozzamento di nervi motori sulla curva di contrazione dei muscoli (*Arch. di Scienze Biol.*, vol. VII, fasc. 3 - 4, 1925).

5. — Sur les altérations anatomiques et fonctionnelles des muscles après l'arrachement et l'étranglement du nerf moteur. (In collaborazione con S. Milone). (*C. R. de l'Assoc. des anatomistes,* XX réunion, 1925).

Sono le prime ricerche sistematiche eseguite su di un animale omeotermo intorno alle modificazioni della curva miografica di un muscolo striato lasciato in sito, conseguenti alla degenerazione e rigenerazione del nervo motore. Sullo stesso argomento non esistono prima di questo che un lavoro di Scaffidi sul gastrocnemio di rana ed uno di Quagliariello sul preparato frenico diaframmatico isolato di cane.

Gli esperimenti vennero eseguiti sul gastrocnemio del ratto albino; il muscolo, lasciato in sito, venne in una parte degli esperimenti riscaldato con una corrente d'acqua calda.

Dalle ricerche dell'A. è risultato che a brevissima distanza (3 giorni) dallo strappamento del nervo sciatico, l'altezza della curva di contrazione è ridotta a poco più della metà in confronto alla curva normale. Questa diminuzione della contrattilità non cangia notevolmente per molti mesi anche quando l'atrofia del muscolo è avanzatissima. Man mano ci si allontana dall'epoca dello strappamento del nervo, decresce la velocità della contrazione muscolare ed è allungata sopratutto la fase di rilasciamento del muscolo esaminato alla temperatura di 38°. Se si fa l'esame alla temperatura di 15° - 18°, la contrazione clonica è seguita da una contrazione tonica e la curva miografica prende allora l'aspetto di cupola. Il miogramma è molto simile a quello osservato dall'A. nella contrazione del gastrocnemio quando la rana venga perfusa con l'alcool etilico a temperature inferiori ai 18.

Questa somiglianza fra l'azione del freddo sul muscolo enervato e quella sul muscolo perfuso con l'alcool etilico sembra all'A. degna di nota.

Dagli esperimenti sulla rigenerazione del nervo è risultato che il muscolo si contrae nuovamente per eccitamento del nervo sciatico dopo 17 giorni dallo strozzamento del medesimo. Il miogramma conserva ancora a questo stadio della rigenerazione del nervo il tipo caratteristico per il muscolo enervato. Dopo un mese dallo strozzamento del nervo aumenta la velocità dell'accorciamento ma la distensione si fa ancora lentamente; quando poi non si riscaldi il muscolo, alla contrazione clonica segue una contrazione tonica non ben pronunciata. Dopo quaranta giorni dallo strozzamento del nervo scompare la contrazione tonica e persiste solamente un rallentamento dell'ultima fase della distensione muscolare.

Il De Caro (« Arch. per le Sc. Biol. », vol. VIII, 141, 1926) sperimentando sul frenico diaframmatico isolato del cane ha ottenuto risultati analoghi a quelli descritti in questo lavoro dall'A.

Nel secondo lavoro (5), i risultati intorno alla curva miografica del muscolo enervato, furono considerati in rapporto ai cambiamenti del quadro istologico, studiati dal Milone sul mu-

scolo tibiale anteriore del ratto albino nei vari stadi della degenerazione e rigenerazione del nervo.

I reperti dell'esame istologico ben si accordano ai risultati ottenuti dall'A. col metodo miografico. E' rimarchevole il fatto che il peso del muscolo diminuisce del 25 % già nei primi giorni dopo l'enervazione. Corrispondentemente l'A. ha constatato che l'altezza della curva di contrazione è diminuita del 50 %, alla distanza di 3 giorni dallo strappamento del nervo. Il Milone notò un graduale calo del peso ma non potè verificare processi di degenerazione delle fibre ed osservò anzi ancora dopo 5 mesi il persistere della striatura trasversale delle medesime. L'esame fisiopatologico ha dimostrato, in perfetto accordo col reperto istologico, che la contrattilità del muscolo è mantenuta ancora dopo 7 mesi dallo strappamento del nervo.

Una eguale corrispondenza fu verificata negli esperimenti di rigenerazione del nervo. Le curve miografiche nel primo stadio della ricomparsa dell'eccitabilità indiretta (17 - 20 giorni) hanno ancora il tipo della contrazione tonica. Dall'esame istologico è risultato infatti che l'inizio della restituzione delle fibre e delle placche motrici è rilevabile istologicamente soltanto dopo il 22° giorno dallo strozzamento del nervo. Tra il 30° - 40° giorno, mentre l'altezza della curva miografica ha già raggiunto valori pressochè normali, il peso del muscolo è ancora inferiore del 30 % a quello normale, ed i processi di atrofia sono ancora evidenti. Questo fatto fa pensare che mentre alcune fibre hanno potuto riprendere la loro funzione per una restituzione « ad integrum » del loro substrato contrattile e dell'apparato nerveo, in altre i processi rigenerativi sono ancora in atto.

13. — Le variazioni del pH nella fibra muscolare dimostrata a mezzo di indicatori iniettati nell'animale vivo (*Boll. della Soc. di Biol. Sperim.*, vol. IV, fasc. 6, 1929).

Questa ricerca venne istituita allo scopo di verificare, per mezzo di indicatori iniettati nell'animale vivo, la reazione della fibra muscolare in sito durante il riposo, l'attività normale ed in certe condizioni patologiche.

In questo studio è originale ed interessante, sopratutto il metodo che permette di esaminare al microscopio una lamina sottilissima di muscolo scheletrico colorato dall'indicatore e di

apprezzarne durante la contrazione, dal cambiamento di tinta, lo spostamento della reazione; tutto questo a circolazione sanguigna perfettamente mantenuta. Il metodo di facile applicazione, purchè ci si attenga scrupolosamente alle indicazioni fornite dall'A., si presta bene anche a dimostrazioni didattiche dell'irrorazione sanguigna del muscolo striato ed a studi microscopici di fisiologia e fisiopatologia dei capillari delle fibre muscolari.

All'epoca nella quale questa ricerca fu eseguita, uno spostamento della reazione verso l'acidità, nella contrazione muscolare, per il formarsi di acido lattico, sembrava definitivamente assodato e su di esso si basano infatti le teorie della contrazione muscolare, tanto quella del Meyerhof e Hill (gelificazione della sostanza contrattile), quanto quella del Bottazzi (cambiamento della tensione superficiale della fase dispersa). E' naturale quindi che l'A. nell'istituire queste ricerche fosse partito col proposito di dimostrare per mezzo di questo metodo più degli altri sensibile, una acidità della fibra muscolare in tutti i casi di contrazione.

E' risultato invece che una reazione acida del muscolo è constatabile soltanto nelle lesioni meccaniche anche lievi, nel tetano prolungato, nel tetano breve quando la circolazione sanguigna sia depressa e nel muscolo messo a contatto col cloroformio. Quando la circolazione della rete capillare si trovi in buone condizioni, l'A. non potè verificare uno spostamento della reazione verso l'acidità nè per una scossa semplice, nè per un tetano breve.

Questi risultati ottenuti dal P. nel 1929, trovarono la loro spiegazione nei lavori eseguiti negli ultimi anni da Lundsgaard, da Meyerhof e da Embden. Da questi AA. è stato infatti dimostrato che nel muscolo avvelenato con l'acido monoiodoacetico si può avere la contrazione, la contrattura e rigidità del muscolo senza produzione di acido lattico; essi osservarono inoltre che in condizioni normali durante la contrazione del muscolo la reazione si sposta verso l'alcalinità, perchè oltre all'acido lattico si formano della creatina e dell'ammoniaca in quantità tali da provocare nel muscolo una reazione basica. Il prevalere dell'acido è un fenomeno che accompagna la fatica muscolare specie se la contrazione avviene in condizioni di anaerobiosi.

Esperimenti in corso eseguiti dall'A. in collaborazione con

Margaria sul gastrocnemio di rana, reso acido col CO_2 e colorato con la porpora bromo cresolo, hanno dimostrato infatti che il muscolo, eccitato ritmicamente, diventa dapprima alcalino e soltanto in un secondo tempo acido.

IV. — **Chimica-fisica delle colorazioni**

7. — Colorazioni istologiche e punto isoelettrico (*Arch. Scienze Med.*, vol. IV, 1927).

8. — La colorazione di elementi fissati in rapporto al punto isoelettrico (*Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, vol. II, fasc. 3, 1927).

In questo lavoro l'A. s'è proposto di verificare se per le colorazioni istologiche fosse valida la teoria di Michaelis, secondo la quale una sostanza solida, dotata di carica elettrica, tende ad adsorbire soltanto le sostanza con carica elettrica di segno contrario.

Intorno a quest'argomento, non esisteva che una ricerca di Pischinger pubblicata nel 1926, dalla quale era risultato che il punto isoelettrico dei singoli costituenti del tessuto è della massima importanza per il loro comportamento rispetto ai colori.

Per saggiare l'importanza delle condizioni elettrochimiche per le colorazioni istologiche, il P. ha colorato strisci di sangue e, spalmate su gli stessi vetrini, sostanze a punto isoelettrico ben conosciuto (stromi di emazie, albume d'uovo, fibrina). Per la colorazione furono usati il bleu di metilene (colore basico), l'eosina e la fuxina acida (colori acidi) disciolti in soluzioni tampone a pH conosciuto.

E' noto che la carica elettrica delle sostanze anfotere, che in prevalenza costituiscono la materia vivente, dipende dalla reazione del liquido da cui le medesime sono bagnate. Queste sostanze sono infatti prive di carica elettrica quando la reazione del liquido corrisponde al loro punto isoelettrico, sono cariche di elettricità positiva o negativa a seconda che questa reazione del liquido sia acida o basica rispetto al loro punto isoelettrico.

L'A. verificò che, in accordo alla teoria del Michaelis, le

quattro sostanze a punto isoelettrico conosciuto, prese in esame, si colorano debolmente con la tinta acida e con quella alcalina quando la reazione del liquido colorante coincida all'incirca con il punto isoelettrico per esse caratteristico e più precisamente quando la reazione del liquido critica per la colorazione si trovi al pH + 0,7 dal loro punto isoelettrico. Ad una reazione più acida esse si tingono solamente con la tinta acida, ad una reazione più alcalina solo con il colore basico.

L'emoglobina dei corpuscoli rossi (punto isoel. pH 6,8) si colora per es. debolmente tanto con l'eosina che con il bleu di metilene quando la reazione del liquido si trova al pH 7,5 (6,8 + 0,7) (vedi tavola a colori della pubblic. N. 7). Quando la soluzione colorante ha una reazione più acida di pH 7,5 viene adsorbita soltanto l'eosina (colore acido), quando la reazione della tinta è più alcalina del pH 7,5 l'emoglobina si tinge soltanto con il bleu di metilene (colore basico). Così si spiega perchè la miscela di Giemsa diluita in acqua distillata, comunemente acida (pH 5,7), colori l'emoglobina dei corpuscoli in rosso (eosina), mentre la stessa miscela, diluita in « acqua fontis », di solito alcalina (pH 8), colori la stessa sostanza in azzurro o verde (bleu di metilene).

Che il punto critico per la colorazione non coincida col punto isoelettrico, ma che il primo sia rispetto al secondo spostato di pH + 0,7, dipende verosimilmente dalla denaturazione delle sostanze proteiche per la fissazione. I punti isoelettrici considerati dall'A. si riferiscono infatti a sostanze non denaturate. E' probabile che la denaturazione per calore o per trattamento con l'alcool, comporti un cambiamento del punto isoelettrico. Il Michaelis per la globulina da siero verificò col metodo della cataforesi per l'appunto uno spostamento di pH + 0,7 del punto isoelettrico per effetto della denaturazione.

Queste ricerche, dalle quali furono confermati con un nuovo metodo i risultati di Pischinger, comprovano in modo evidentissimo che anche per le colorazioni istologiche valgono le leggi dell'adsorbimento elettrochimico (teoria di Michaelis).

Da uno studio sistematico circa il pH al quale il nucleo, il protoplasma ed i granuli acidofili delle cellule del sangue si tingono o con il colore basico o con quello acido, l'A. potè avere qualche indicazione circa il probabile punto isoelettrico

di queste parti cellulari. *Questi punti isoelettrici* (*nuclei pH 2,8 - 3,8, protoplasma pH 4,9, granuli acidofili pH > 10*) *proposti dall'A., i quali ancora non erano conosciuti, vennero senz'altro accolti da H. Pfeiffer in un elenco dei punti isoelettrici sinora accertati* (« Elektrizität u. Eiweisse », vol. XXI dei wissensch. Forschungsberichte, 1929).